

課題番号 20

がん遺伝子のタンパク質相互作用を指標とした 新規創薬標的の同定

[1] 組織

代表者：中奥 敬史
(国立がん研究センター研究所)
対応者：宇井 彩子
(東北大学加齢医学研究所)
分担者：
額賀 重成 (国立がん研究センター研究所)
丸山 宏輔 (国立がん研究センター研究所)

研究費：物件費 13 万円

[2] 研究経過

がんゲノム医療の実装により、臨床情報と紐付いたがんゲノムの実世界データの蓄積が進みつつある。しかしながら、見つかる遺伝子異常の大部分は意義不明であり、10%程度しか標的治療薬に結びついていない。申請者らは、がん患者由来の遺伝子異常に対して、細胞や精製タンパク質を用いた *in vitro* 実験と分子動力学シミュレーションを組み合わせることで、変異による活性や薬剤感受性変化による意義付けが可能であることを示してきた(Nakaoku T, et al. Nat Commun. 2018, Wirth, Kohno et al, JCO Pres Oncol, 2019)。また、サンプル中の複数の遺伝子間に共有される変異情報の解析により、がん遺伝子上の変異にはタンパク質相互作用を起こすドメインに集積する傾向があり、変異産物の協調的な働きによる相互作用変化が、がん形質獲得の一因となることがわかってきた。そこで、本研究では、大規模ゲノムデータをもとに共有される変異情報を収集し、その統計学的な有意性と変異産物によるタンパク質相互作用変化ががん形質に与える影響を理解し、治療標的性を明らかにすることを目標とする。

以下に本研究実施にあたり、設けた研究実施項目ごとに、おける研究経過を記載する。

- ゲノム情報の収集とインフォマティクスによる共変異マッピング・有意変異の選出
国立がん研究センターの有する 1500 例の肺がん症

例のゲノム情報と、TCGAやGENIE等の大規模Pan-cancer コホートから得られる 100,000 例以上のゲノム情報を収集した。サンプル内で見つかる変異情報は、塩基置換型や欠失・挿入型の遺伝子異常を対象に集積性を残基単位で収集した。有意変異集積を捉えるインフォマティクス手法を開発し、がん形質獲得への寄与が想定されるタンパク質相互作用変化の候補を同定した(図1)。

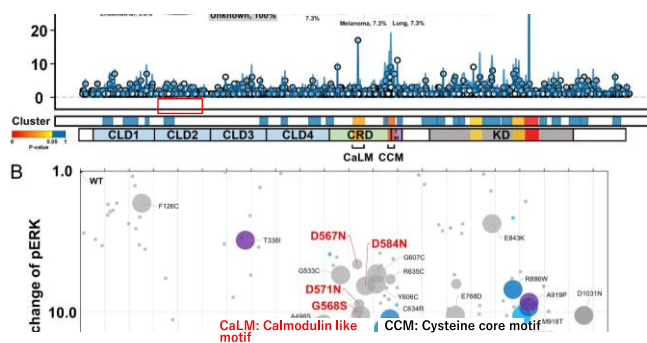


図1 RET 遺伝子上に見つかる変異集積

2. 変異の *in vitro* 解析データ取得

発現ベクターライブラリーを用いて、293H 細胞に対しての一過性発現系によるシグナル変化と NIH-3T3 細胞への安定発現モデルを用いてコロニー形成能にて、がん形質に関わる獲得機能を評価した。そのうちの一か所である細胞外ドメイン上の Ca 結合モチーフの変異群については、これまで機能獲得を認めるものの腫瘍における機能意義が不明であったため、同部位の変異集積を今後の解析対象として選定した。

対応者である、宇井彩子准教授との共同研究を通じて、この遺伝子異常をドキシサイクリン誘導下で安定発現させた 293 細胞を樹立した。変異タンパク質産物を発言させると、非還元化での RET タンパク質の 2 量体化が認められた(図1)。

また、Ca イオンを培養細胞培地から除去すると変異体に与える影響は乏しい一方で、野生型は 2 量体化の促進が認められた(図2)。

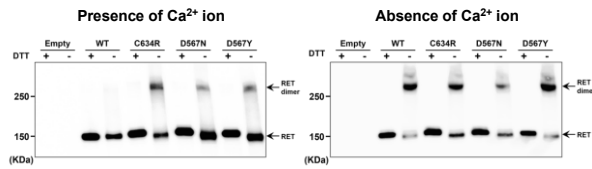


図2 変異体による2量体形成

この2量体化によりRETタンパク質と下流シグナルのリン酸化への関連性が認められた。また、当該変異を有するドメインの局所的なコンストラクトとして発現させた精製タンパクを取得することができ、タンパク質の相互作用を調べると、変異体では、2量体化が確認した(図3)。

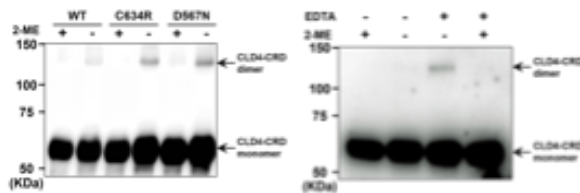


図3 精製タンパク質を用いた2量体形成

また安定発現させたBa/F3細胞モデルにおいてはRET特異的な阻害剤に対して感受性が認められ、新たな治療標的として期待のできる結果が得られた。

加齢研側の対応教員である宇井彩子准教授とは、およそ2~3ヶ月に1回程度の研究進捗についてWebおよび面談での継続的な情報共有を行うとともに、細胞株の活用案や精製タンパク質実験における研究方針について注意深くディスカッションを行った。

[3] 成果

(3-1) 研究成果

本研究では、RET細胞外ドメイン上に生じる変異がCa²⁺イオンの局在性変化が生じさせる。また、それに伴うタンパク質構造変化はシステイン残基を露出させ、2量体形成を開始した恒常的な活性化をもたらすことを明らかにした。タンパク質の構造変化は分子動力学シミュレーションを用いた動的構造解析により、明らかにすることに成功した。これらのタンパク質相互作用解析を細胞モデルや精製タンパク質を用いて実験的にも証明しており、分子動力学シミュレーションが変異機能解析に有効であることを報告した(特許出願論文発表済「特願2022-89905」(令和4年6月1日)、Tabata, Nakaoku et al, Cancer Res, 2022)。

(3-2) 波及効果と発展性など

本研究成果により、新規変異群を検出することによるRETキナーゼ阻害薬への応答が見込まれるがん患

者の同定法の開発につなげる導出へつながっている。RETキナーゼに対する阻害薬は世界で開発されており、米国では肺がんや甲状腺がんに対して、セルパカチニブとプラルセチニブが承認され、前者は本邦でも保険収載されている。その治療効果は上記以外のがん種でも示され、pan-cancerでの承認が期待されている。本研究に見出したRET変異は、現在のRET阻害剤治療のコンパニオン診断薬が対象としない新規のものであり、その検出はRETキナーゼ阻害薬が高い治療効果をもたらすがん患者の同定をもたらし、進行がんの個別化治療の推進への寄与が期待される。

また、本研究では、変異の機能理解に、実験手法と分子動力学シミュレーションを組み合わせた新たな機能解析法を用いた。この手法を応用することで、これまで機能意義の明らかでなかった変異の機能理解への応用が考えられ、変異機能情報を取得することで、がんゲノム医療への寄与を引き続き図っていく。

[4] 成果資料

(1) Tabata J, Nakaoku T (Corresponding author)*, Araki M, Yoshino R, Kohsaka S, Otsuka A, Ikegami M, Ui A, Kanno SI, Miyoshi K, Matsumoto S, Sagae Y, Yasui A, Sekijima M, Mano H, Okuno Y, Okamoto A, Kohno T*. Novel Calcium-Binding Ablating Mutations Induce Constitutive RET Activity and Drive Tumorigenesis. Cancer Research, 82(20):3751-3762, 2022.

(2) Kosuke Maruyama, Takashi Nakaoku, Junya Tabata, Shigenari Nukaga, Takashi Kohno, Development of a 3D-structure-based drug response model to help annotating kinase mutations (優秀ポスター受賞), 第81回日本癌学会学術総会、2022/9/30、国内、ポスター

(3) Takashi Nakaoku, Junya Tabata, Kosuke Maruyama, Shigenari Nukaga, Takashi Kohno, Functional annotation of variants of unknown significance on RET kinase gene, 第81回日本癌学会学術総会、2022/9/30、国内、口演